

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510036150.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2007年1月31日

[11] 公开号 CN 1904616A

[22] 申请日 2005.7.28

[21] 申请号 200510036150.9

[71] 申请人 广州市第一人民医院

地址 510180 广东省广州市盘福路1号广州市第一人民医院

[72] 发明人 徐邦牢 贝春花 王 蓉 刘万里
张 革

[74] 专利代理机构 广州三辰专利事务所

代理人 范钦正

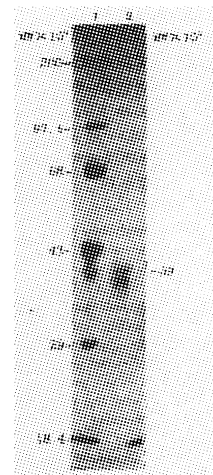
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

[54] 发明名称

早期预测急性冠脉综合症诊断试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了早期预测急性冠脉综合症(ACS)的诊断试剂盒,其组成是以sCD40L标准蛋白为生化指标、包括sCD40L单克隆和多克隆抗体、用生物素标记的sCD40L单抗作为二抗;用多sCD40L克隆抗体包被酶标板;以HRP-多聚赖氨酸-链亲和素复合物作为检测信号放大系统。本试剂盒是一种超灵敏检测血清sCD40L ELISA试剂盒,可以早期预测ACS的发病风险,大大改善临床治疗效果,提高患者治愈率。



1、一种早期预测急性冠脉综合症诊断试剂盒,包括 sCD40L 标准蛋白、sCD40L 单克隆和多克隆抗体、封闭液、酶底物溶液、包被缓冲液、终止液、洗涤液及酶标板,其特征是以 sCD40L 标准蛋白为生化指标,用生物素标记的 sCD40L 单抗作为二抗标记物、用 sCD40L 多克隆抗体包被酶标板、以 HRP—多聚赖氨酸—链亲和素复合物作为检测信号放大系统。

2、权利要求 1 的诊断试剂盒,其特征在于 sCD40L 标准蛋白是采用基因工程法制备,该方法包括从淋巴细胞提取 mRNA,针对 sCD40L 的膜外部分氨基酸 52—261 设计两对特异性引物,RT-PCR 扩增,cDNA 克隆入 pGEM-T 载体,测序确证后再亚克隆入 N 断带 His 标签的 pET-28a 原核表达载体,用 IPTG 诱导目的蛋白的表达,用亲和柱纯化。

3、权利要求 1 的诊断试剂盒,其特征在于 sCD40L 多克隆抗体是用原核表达纯化的 His-sCD40L 蛋白免疫兔子,以获得含 sCD40L 多克隆抗体的兔血清,先用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀法初步纯化 IgG,再用亲和层析柱进一步纯化,最后鉴定分离纯化。

4、权利要求 1 的诊断试剂盒,其特征在于 sCD40L 单克隆抗体是将原核表达纯化的 His-sCD40L 蛋白免疫小鼠,得到抗原刺激的脾细胞,取脾细胞与 SP2 细胞融合,用 HAT 选择培养基选择杂交瘤细胞株,用 ELISA 法鉴定产 sCD40L 抗体的细胞,挑取抗体阳性的细胞株,单克隆化并扩大培养,细胞株注射小鼠腹腔,收集腹水,分装,冷冻保存。

5、权利要求 1 的诊断试剂盒,其特征在于 HRP—多聚赖氨酸—链亲和素复合物是采用碳二亚胺法把 HRP 标记到活化的树枝状载体上,用过碘酸法将链亲和素标记到 HRP—多聚赖氨酸复合物上,并层析纯化。

早期预测急性冠脉综合症诊断试剂盒

技术领域

该发明涉及早期预测急性冠脉综合症（ACS）的诊断试剂盒，具体的说是涉及以原核表达人可溶性 CD40 配体（sCD40L）蛋白为抗原，制备单克隆和多克隆 sCD40L 抗体；以 HRP—多聚赖氨酸—链亲和素复合物作为检测信号放大系统以检测血清 sCD40L 的超灵敏 ELISA 试剂盒，以用于 ACS 的心血管事件发生风险的技术领域。

背景技术

ACS 是现今严重威胁人类生命和健康的常见病和多发病，因此早期预测该疾病的发生风险对临床上采取有效的防治措施具有重要意义。但目前对该疾病的临床控制却不够理想，主要原因是不能对 ACS 的发病作出早期发病风险预测，因而延误了对该病的治疗。诊断 ACS，目前主要的生化检查是测定心肌坏死的标志物，包括酶类及肌钙蛋白（cTnT），但这些标志物只能反应心肌坏死的程度或范围，而不能给临床提供有关心肌坏死前血栓形成阶段的病理生理信息。因此不能更早期预测 ACS 的发生风险。原核表达人可溶性 CD40 配体（sCD40L）蛋白是肿瘤坏死因子家族中的跨膜 II 型膜蛋白，以同源三聚体形式存在，与其受体 CD40 在动脉粥样硬化及血栓形成过程起重要作用。研究证实免疫细胞、血管内皮细胞及血小板都可以表达 CD40 和/或 CD40L，而 95%的血清 sCD40L 来源于活化的血小板，它的水平增高发生在患者临床症状出现之前，因此比其它指标更能早期地预测 ACS 冠脉事件的发生。事实上，已有大量研究表明 sCD40L 是良好的早期预测 ACS 发病风险的生化指标。由于其血清含量在“微克/升”水平，普通 ELISA 试剂盒已不能符合检测要求，所以目前迫切需要研制一种超灵敏检测 sCD40L ELISA 试剂盒，以大大改善临床治疗效果，提高患者治愈率。

发明内容

本发明的目的是开发一种超灵敏检测血清 sCD40L ELISA 试剂盒，以早期预测 ACS 的发病风险，大大改善临床治疗效果，提高患者治愈率。

本发明的技术方案在于：一种早期预测急性冠脉综合症诊断试剂盒，包括 sCD40L 标准蛋白、sCD40L 单克隆和多克隆抗体、封闭液、酶底物溶液、包被缓冲液、终止液、洗涤液及酶标板，其特征是以 sCD40L 标准蛋白为生化指标，用生物素标记的 sCD40L 单抗作为二抗标记物、用 sCD40L 多克隆抗体包被酶标板、以 HRP—多聚赖氨酸—链亲和素复合物作为检测信号放大系统。

所述的诊断试剂盒，其特征在于 sCD40L 标准蛋白是采用基因工程法制备，该方法包括从淋巴细胞提取 mRNA，针对 sCD40L 的膜外部分氨基酸 52—261 设计两对特异性引物，RT-PCR 扩增，cDNA 克隆入 pGEM-T 载体，测序确证后再亚克隆入 N 断带 His 标签的 pET-28a 原核表达载体，用 IPTG 诱导目的蛋白的表达，用亲和柱纯化。

所述的诊断试剂盒，其特征在于 sCD40L 多克隆抗体是用原核表达纯化的 His-sCD40L 蛋白免疫兔子，以获得含 sCD40L 多克隆抗体的兔血清，先用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀法初步纯化 IgG，再用亲和层析柱进一步纯化，最后鉴定分离和纯化。

所述的诊断试剂盒，其特征在于 sCD40L 单克隆抗体是将原核表达纯化的 His-sCD40L 蛋白免疫小鼠，得到抗原刺激的脾细胞，取脾细胞与 SP2 细胞融合，用 HAT 选择培养基选择杂交瘤细胞株，用 ELISA 法鉴定产 sCD40L 抗体的细胞，挑取抗体阳性的细胞株，单克隆化并扩大培养，细胞株注射小鼠腹腔，收集腹水，分装，冷冻保存。

所述的诊断试剂盒，其特征在于 HRP—多聚赖氨酸—链亲和素复合物是采用碳二亚胺法把 HRP 标记到活化的树枝状载体上，用过碘酸法将链亲和素标记到 HRP—多聚赖氨酸复合物上，并层析纯化。

所述的诊断试剂盒，其特征是用生物素标记 sCD40L 单克隆抗体作为二抗，并纯化：用 EZ-Link TFP-PE0-Biotin (Pierce) 生物素标记试剂盒，按常用操作方法标记 sCD40L 单克隆抗体，透析去掉未标记的生物素，用 Dot-ELISA 法鉴定生物素标记效率。

所述的诊断试剂盒，其中封闭液是 1% 的白明胶溶液；酶底物溶液是 TMB 应

用液，即 60ug/ml TMB、0.045% H₂O₂ 与 0.1M pH6.0 磷酸盐缓冲液的混合液；包被缓冲液为 0.05M pH9.6 的碳酸盐缓冲液：即 1L 溶液中含 1.59g Na₂CO₃，2.93g NaHCO₃；终止液为 2M H₂SO₄ 溶液；洗涤液为 0.01M pH7.4 的 PBS 缓冲液，其中含 0.05% Tween-20，即 1L 溶液中含 8g NaCl、0.2g KH₂PO₄、2.9g Na₂HPO₄·12H₂O，0.2g KCl、0.5ml Tween-20。

发明原理及积极效果分析：

该发明以原核表达人可溶性 CD40 配体蛋白 sCD40L 为生化指标，来早期预测 ACS 的发病风险。原理包括 ACS 的临床发病机理和上述基本研发技术，最终目的是研制出一种高效、超灵敏检测血清 sCD40L 水平 ELISA 试剂盒。

该发明用多抗包被 ELISA 板，不但节约了成本，而且简化了实验工序；用生物素标记的单抗作为二抗，以提高检测的特异性；以交联 8 分子并具有 HRP 酶活性的 HRP-多聚赖氨酸-链亲和素复合物作为检测信号放大系统，从而大大提高了检测的灵敏度。该发明通过检测 sCD40L 水平可早期预测 ACS 心血管事件的发生风险，能准确反映血栓形成阶段的病理生理信息，比常规反映心肌梗死的指标如酶类及肌钙蛋白（cTnT）等要早，因此达到早期诊断和预测的目的。研究证实，检测 sCD40L 水平可预测健康人及 ACS 患者心血管事件的发生风险，因此又可达到早期防治的目的，这也是临床医生期待实验工作者迫切需要解决的一个问题。超灵敏检测血清 sCD40L 水平 ELISA 试剂盒的研制正应和了此要求，并行将解决此问题，因此也必将产生巨大的社会及经济效益。

本发明实验结果及分析：

1、sCD40L 标准蛋白的表达与纯化：采用基因工程法制备 sCD40L 标准蛋白：从淋巴细胞提取 mRNA，针对 sCD40L 的膜外部分氨基酸 52-261 设计两对特异性引物，RT-PCR 扩增。cDNA 克隆入 pGEM-T 载体，测序确证。再亚克隆入 N 断带 His 标签的 pET-28a 原核表达载体，用 IPTG 诱导目的蛋白的表达；经 SDS-PAGE 鉴定，在 39KD 处有一条蛋白带（图 1）；同时经 Western Blotting 发现只在 39KD 处有一条蛋白带（图 2），表明得到的蛋白为目的蛋白。该发明利用基因工程的

方法制备 sCD40L 标准蛋白，取代了从血清直接分离纯化 sCD40L 的方法，不仅取材容易，而且简化了操作过程，节省了实验耗费。

2、抗 sCD40L 抗体的制备与纯化：

1) 抗 sCD40L 单克隆抗体的制备及纯化：该发明制备了高亲和力、高特异性、高效价的单抗 IgG，利用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀法和 SPA-Sepharose 亲和层析柱从杂交瘤细胞培养上清液中分离纯化后得到抗 sCD40L 单克隆抗体，经 SDS-PAGE 鉴定，在 67KD 和 42KD 处有两条蛋白带，分别为 IgG 的重链和轻链；同时经 Western Blot 鉴定可与纯化的 sCD40L 标准蛋白杂交，表明分离纯化所得到的 IgG 为特异性抗 sCD40L 单克隆抗体。

2) 抗 sCD40L 多克隆抗体的制备及纯化：该发明利用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀法和 sCD40L-Sepharose 亲和层析柱从兔血清中分离纯化得到高特异性、高亲和力和高价价的抗 sCD40L 多克隆抗体，经 SDS-PAGE 鉴定，在 67KD 和 42KD 处有两条蛋白带，分别为 IgG 的重链和轻链，同时经 Western Blot 鉴定可与纯化的 sCD40L 标准蛋白杂交，表明分离纯化所得到的 IgG 为特异性抗 sCD40L 多克隆抗体。

3、抗 sCD40L 单克隆抗体及 HRP—多聚赖氨酸复合物的标记：用试剂盒（碳二亚胺法，Pierce 产品）把 HRP（辣根过氧化物酶）标记到活化的树枝状多聚赖氨酸载体上，再用过碘酸法将链亲和素标记到 HRP—多聚赖氨酸复合物上，用 Dot-ELISA 法检测酶复合物具有高酶活性；用 EZ-Link TFP-PEO-Biotin (Pierce) 生物素标记试剂盒，按常用的操作方法标记抗 sCD40L 单克隆抗体，透析去掉未标记的生物素，经 Dot-ELISA 法鉴定，生物素的标记效率高。

4、用该发明开发的抗 sCD40L 多克隆抗体、生物素标记的抗 sCD40L 单克隆抗体及 HRP—多聚赖氨酸—链亲和素复合物制备血清 sCD40L 试剂盒，经精密度试验（批内，批间 CV），灵敏度试验（系列稀释法），干扰试验（高脂血，溶血，黄胆的干扰），回收试验（加入 sCD40L 标准品），表明我们建立的超敏 ELISA 试剂盒具有高灵敏、高特异性。并测定 223 例健康成人、137 例 ACS 患者的血清 sCD40L 水平，前者 sCD40L 浓度均小于 0.52ng/ml；我们测定了 137 例经 6 个月

随访的 ACS 患者的血清 sCD40L 水平，并统计其心血管事件的发生风险（见附表和附图），事实上，我们的结果与临床观察结果高度一致，表明该指标可早期预测 ACS 心血管事件的发生风险，因而对早期防治 ACS 具有重要临床价值。

附表 6 个月随访后发生死亡或非致命性心肌梗塞的风险比率筛选结果

| 变量 | 风险比率 (95%CI) | P 值 |
|---------------------|------------------|-------|
| 男性 | 0.91 (0.68—1.39) | 0.15 |
| 年龄 >65 岁 | 1.35 (0.92—1.81) | 0.33 |
| 糖尿病 | 1.23 (0.81—1.47) | 0.62 |
| 高胆固醇血症 | 0.90 (0.66—1.12) | 0.57 |
| 高血压 | 1.00 (0.89—1.04) | 1.00 |
| sCD40L >5 μ g/L | 2.72 (1.53—5.37) | 0.001 |

附图说明

图 1：不同时间 ACS 患者死亡或非致命性心肌梗塞的发生率

图 2：sCD40L 标准蛋白的表达与纯化。

蛋白 Marker 分子量为：18.4KD，29 KD，43 KD，68 KD，97.4 KD，200 KD；
sCD40L 标准蛋白的分子量为 39KD；

图 3：Western Blot 进一步鉴定 sCD40L 标准蛋白

Western Blot 鉴定 sCD40L 标准蛋白，在 39KD 处只有一条带。

具体实施例

实施例 1、克隆、表达、纯化、鉴定 sCD40L：

从 Gene Bank 中搜索人 sCD40L 基因，并设计引物，经 RT-PCR 扩增后，将 cDNA 克隆入 pGEM-T 载体，测序确证。再亚克隆入 N 断带 His 标签的 pET-28a 原核表达载体，提取质粒，双酶切鉴定；鉴定正确的重组子转化 BL21 感受态细胞，提取质粒，双酶切鉴定；挑取含重组子菌落，37℃ 振荡培养，用 IPTG 诱导目的蛋白的表达；用 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的表达，优化表达条件，使目的蛋白以可溶的形式表达；大量表达目的蛋白，用 NTA-Ni 柱亲和柱纯化带 His 标签的目的蛋白，SDS-PAGE 分离鉴定所表达的目的蛋白。

实施例 2、制备、纯化、鉴定、标记抗 sCD40L 单克隆抗体：

原核表达纯化的 His-sCD40L 蛋白，免疫 BALB/c 小鼠 隔 3 周后同样加强免疫二次，最后一次加强免疫后 2 周，取脾细胞与 SP2 细胞融合，HAT 选择培养基，培养 3 周，取上清分别用纯化的 His-sCD40L 初步筛选单抗，然后用 sCD40L 蛋白包被的 ELISA 板检测抗体，分别挑取抗体阳性的细胞株，单克隆化，HT 选择培养基培养三周后，取上清 ELISA 法测抗体，阳性克隆株扩大培养，细胞株注射 BALB/c 小鼠腹腔，2 周后，收集腹水，分装，-20℃，保存。Western Blotting 和 ELISA 验证所制备的单抗。用 EZ-Link TFP-PEO-Biotin (Pierce) 生物素标记试剂盒，按常用的操作方法标记抗 sCD40L 单克隆抗体，透析去掉未标记的生物素，经 Dot-ELISA 法鉴定，生物素的标记效率高。

实施例 3、制备、纯化、鉴定抗 sCD40L 多克隆抗体：

用纯化的 sCD40L 蛋白免疫兔子，免疫 2 次，间隔 1 个月；取兔子全血，先利用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀法从兔子的血清中初步纯化 IgG，再用自制 sCD40L-Sepharose 亲和层析柱进一步纯化抗 sCD40L 的 IgG，SDS-PAGE 及 Western Blot 鉴定该多抗。

实施例 4、用于超敏 ELISA 法测定血清 sCD40L 浓度时所需各种溶液的配制及操作步骤：

1)、酶底物溶液 (TMB 应用液)

- ① TMB 原液：TMB 60mg，加入 DMSO 至 10ml，4℃ 保存；
- ② TMB 应用液 (现配)：PBS 缓冲液 10ml+ TMB 原液 100ul，30% H_2O_2 15 ul；
- ③ 0.1M pH6.0 PBS 溶液；

2)、包被缓冲液

0.05M pH9.6 Na_2CO_3 - NaHCO_3 溶液： Na_2CO_3 1.59g， NaHCO_3 2.93 g，用蒸馏水溶至 1000 ml；

3)、洗涤液 (pH7.4 的 PBS-Tween20 溶液)

NaCl 8.0 g， KH_2PO_4 0.2g， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g，KCl 0.2g，Tween 20 0.5ml，

用蒸馏水溶至 1000 ml, 备用;

4)、封闭液 (1%白明胶溶液)

白明胶 1g, 用洗涤液溶至 100 ml;

5)、终止液 (2M H₂SO₄溶液)

将 22.2ml 98% H₂SO₄ 浓缓慢加入 177.3ml 蒸馏水中, 边加边搅动。

实施例 5、制定标准曲线

用包被液将纯化的抗 sCD40L 多克隆抗体稀释至 1ug/ml, 加入到 96 孔 ELISA 板板孔中, 每孔 100u1, 4℃包被过夜; 用洗涤液洗板 3 次, 甩干孔内液体, 加入 1%白明胶封闭, 每孔 200 u1, 室温下保温 1 小时; 用洗涤液洗板 3 次, 甩干孔内液体, 加入不同浓度的 sCD40L (0—20ug/l) 的标准蛋白抗原, 每孔 100 u1, 室温下保温 1 小时; 用洗涤液洗板 3 次, 甩干孔内液体; 加入生物素标记的抗 sCD40L 单克隆抗体 (用洗涤液稀释至 1ug/ml), 每孔 100 u1, 室温下保温 1 小时; 用洗涤液洗板 3 次, 甩干孔内液体; 加入 HRP—多聚赖氨酸—链亲和素复合物, 每孔 100 u1, 室温下保温 1 小时; 用洗涤液洗板 3 次, 甩干孔内液体, 加入酶底物溶液, 每孔 100u1, 暗处显色 5 分钟, 加入终止液, 每孔 50 u1, 用酶标仪在 450nm 处测定吸光度 (A₄₅₀); 以浓度 (ug/l) 为横坐标, A₄₅₀ 为纵坐标, 绘制标准曲线。

实施例 6、测定血清 sCD40L 浓度

于已包被好的 ELISA 板孔中加入 100u1 待检血清标本, 室温下保温 1 小时, 用洗涤液洗板 3 次, 甩干孔内液体; 加入生物素标记的抗 sCD40L 单克隆抗体 (用洗涤液稀释至 1ug/ml), 每孔 100 u1, 室温下保温 1 小时; 用洗涤液洗板 3 次, 甩干孔内液体; 加入 HRP—多聚赖氨酸—链亲和素复合物, 每孔 100 u1, 室温下保温 1 小时; 用洗涤液洗板 3 次, 甩干孔内液体, 加入酶底物溶液, 每孔 100u1, 暗处显色 5 分钟, 加入终止液, 每孔 50 u1, 用酶标仪在 450nm 处测定 A₄₅₀, 根据标准曲线, 求得血清 sCD40L 浓度。sCD40L 的 cut-off 值为 0.52 ug/l, 以此进行 ACS 心血管事件的风险评估。

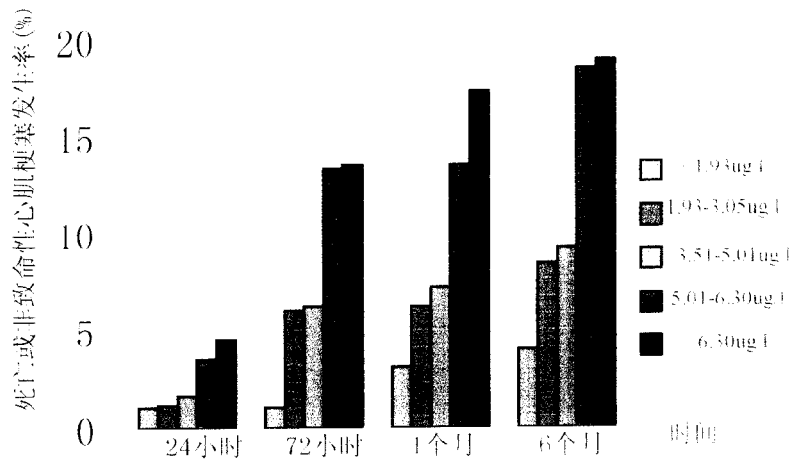


图 1

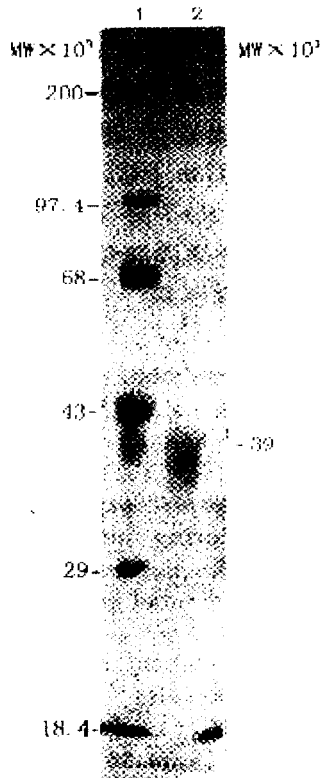


图 2

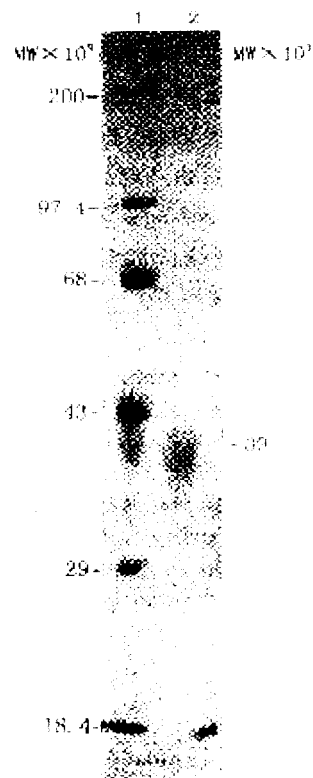


图 3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 早期预测急性冠脉综合症诊断试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN1904616A | 公开(公告)日 | 2007-01-31 |
| 申请号 | CN200510036150.9 | 申请日 | 2005-07-28 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 广州市第一人民医院 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 广州市第一人民医院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 广州市第一人民医院 | | |
| [标]发明人 | 徐邦牢 贝春花 王蓉 刘万里 张革 | | |
| 发明人 | 徐邦牢 贝春花 王蓉 刘万里 张革 | | |
| IPC分类号 | G01N33/577 G01N33/543 G01N33/531 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了早期预测急性冠脉综合症(ACS)的诊断试剂盒，其组成是以sCD40L标准蛋白为生化指标、包括sCD40L单克隆和多克隆抗体、用生物素标记的sCD40L单抗作为二抗；用多sCD40L克隆抗体包被酶标板；以HRP - 多聚赖氨酸 - 链亲和素复合物作为检测信号放大系统。本试剂盒是一种超灵敏检测血清sCD40L ELISA试剂盒，可以早期预测ACS的发病风险，大大改善临床治疗效果，提高患者治愈率。

